

بررسی جهش در اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 به روش PCR-SSCP/HA در بیماران کاردیومیوپاتی هایپرتروفی استان چهارمحال و بختیاری

الناز سعیدی^۱، مرتضی هاشم زاده چالشتی^{۲*}، عباس دوستی^۱، شهربانو پرچمی برجویی^۲
^۱مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۹

چکیده:

زمینه و هدف: کاردیومیوپاتی هایپرتروفی (HCM) رایج ترین نوع بیماری قلبی با وراثت تک ژنی است که با ضخیم شدن دیواره بطن چپ، اختلال عملکرد انقباضی و آریتمی های بالقوه کشنده مشخص می شود. پیشرفت های زیادی در روشن سازی اساس ژنتیکی HCM به عمل آمده و در نتیجه بیش از ۹۰۰ جهش منحصر به فرد در بیش از ۲۰ ژن شناسایی شده است. جهش در ژن MYBPC3 (که کد کننده پروتئین C متصل شونده به میوزین قلبی است)، عامل حدود ۴۰٪ از موارد بالینی HCM است. این مطالعه با هدف بررسی احتمال وجود جهش در اگزون های ۲۷ و ۲۹ MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

روش بررسی: ۳۰ فرد مبتلا به HCM مراجعه کننده به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در نظر گرفته شد و به منظور استخراج DNA از نمونه های خون این بیماران از روش استاندارد فتل - کلروفرم استفاده شد. با استفاده از روش واکنش های زنجیره ای پلیمرز اگزون های ۲۷ و ۲۹ تکثیر شدند و با روش چند شکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) به صورت تک رشته ای تبدیل شدند و همراه با نمونه ای ۲ رشته ای روی ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند.

یافته ها: DNA استخراج شده الکتروفورز و نسبت جذب آن ها اندازه گیری شد که نتایج آن ها نشان دهنده ی استخراج مناسب و کیفیت مطلوب DNA می باشد. با بررسی نتایج حاصل از الکتروفورز چند شکلی فضایی تک رشته ای SSCP/HA در هیچ یک از نمونه ها تغییری در اگزون های ۲۷ و ۲۹ MYBPC3 مشاهده نشد.

نتیجه گیری: هیچ کدام از بیماران مورد مطالعه در اگزون های ۲۷ و ۲۹ MYBPC3 جهش نداشتند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه در بیماران مبتلا به HCM با توارث اتوزومی غالب هیچ گونه تغییری در اگزون های ۲۷ و ۲۹ MYBPC3 مشاهده نشد. نتیجه گیری می شود که اگزون های ۲۷ و ۲۹ MYBPC3 در ایجاد بیماری HCM در بیماران مورد مطالعه نقش ندارند.

واژه های کلیدی: کاردیومیوپاتی هایپرتروفی، جهش، MYBPC3، PCR-SSCP/HA.

مقدمه:

است (۲). از ویژگی های آن، ضخیم شدن دیواره بطن چپ که منجر به کاهش فضای بطن چپ می شود، بی نظمی سارکومری، به هم ریختگی میوفیبریل ها (Myofibrils)، ایسکمی (Ischemia) میوکاردا، اختلال دیاستول (Diastole)، ضربان نامنظم قلب و مرگ ناگهانی است (۳). ویژگی های

یک نوع بسیار رایج از بیماری های قلبی با وراثت مندلی کاردیومیوپاتی هایپرتروفی (Hypertrophic Cardiomyopathy= HCM) است که ۲٪ از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده است (۱). HCM همچنین دلیل بسیار رایج مرگ های ناگهانی قلبی در افراد جوان تر از ۳۵ سال سن

پاتولوژیک مشخصه HCM شامل هایپرتروفی قلب نامتقارن و یا متقارن، فیروز (Fibrosis) و بی نظمی سلول عضله قلبی است (۴). فنوتیپ بالینی بسیار متغیر است و دامنه آن از فقدان علائم بیماری در تمام عمر تا پیشرفت سریع نارسایی قلبی یا مرگ قلبی ناگهانی در ابتدا و گاهی اوقات با کمی و یا حتی بدون هایپرتروفی است (۵). تحقیقات و مطالعات زیادی جهت تشخیص سهم ژنتیک در HCM انجام شده است که نتیجه آن ها تشخیص بیش از ۹۰۰ جهش در ۲۰ ژن کد کننده پروتئین های سارکومری بوده است. از جمله مهم ترین این ژن ها، ژن های MYBPC3، MYH7 و TNNT2 می باشند که در این میان ژن MYBPC دارای اهمیت زیادی است. نام رسمی این ژن: پروتئین C باند شده به میوزین (MyBP-C)، قلبی است و مکان دقیق آن به وسیله نقشه یابی هیبریداسیون لوکوس D11S4133 و D11S1326 مشخص گردیده است (۶، ۷). به نظر می رسد که این ژن در ساختار و سیگنالینگ انواع عضلات نقش مهمی را ایفا می کند. cMyBP-C در سلول های ماهیچه ای با سارکومر همراه است و با اتصال به رشته های ضخیم، آن ها را از شکسته شدن حفظ می کند و به این ترتیب ممکن است در پایداری سارکومر نقش داشته باشد (۸). در MYBPC تعداد ۲۷ جهش در خانواده های غیر مرتبط شناسایی شده است (۶، ۹، ۱۰). بسیاری از جهش هایی که در ژن MYBPC3 یافت شده اند شامل حذف های نواحی پیرایش، مضاعف شدگی ها یا جهش های بی معنی می باشد که پیش بینی شده است، پروتئین های ناقص تولید می کنند (۱۱). در مطالعه ای که در آمریکا روی ۳۸۹ بیمار مبتلا به HCM انجام شد، ۷۱ نفر (۱۸٪) از بیماران در ژن MYBPC3 جهش داشتند که در اگزون ۲۷، ۳ تغییر نوکلئوتیدی و همچنین در اگزون ۲۹ یک تغییر نوکلئوتیدی شناسایی شد (۱۲). در مطالعه ای که در اسپانیا روی ۱۲۰ بیمار مبتلا به HCM انجام شد، ۲۰ نفر (۱۶٪) از بیماران در ژن MYBPC3 جهش داشتند که در یک بیمار در

اگزون ۲۹ ژن MYBPC3 یک جهش شناسایی شد (۱۳). از آنجا که در دیگر مناطق در اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM جهش گزارش شده بود و در این مناطق جهش در اگزون های مزبور در ایجاد بیماری نقش دارد، مطالعه حاضر، با هدف شناسایی جهش در اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری و با استفاده از روش PCR-SSCP/HA (Single Strand Conformation Polymorphism= SSCP) یک تکنیک ساده، ارزان و حساس است و در واقع یک روش غربالگری بر روی محصولات (Polymerase Chain Reaction= PCR) جهت جداسازی نمونه های دارای جهش می باشد. این تکنیک روشی است که قادر است، اغلب تفاوت های توالی را در یک DNA تک رشته ای (دارای ۱۰۰ تا ۳۰۰ نوکلئوتید) تشخیص دهد. این روش بر اساس شناسایی شکل فضایی ترکیب ایجاد شده در DNA تک رشته ای استوار است. این اشکال فضایی حتی با افزایش یا کاهش یک باز آلی، تغییر خواهند کرد (۱۴). به همین دلیل با استفاده از این روش می توان به صورت دقیقی در صورت بروز تغییر در بازهای رشته DNA به آن ها پی برد و این تغییرات را بررسی کرد.

هتروداپلکس ها (Heteroduplex) بین آلل های مختلف DNA شکل می گیرند. اگر DNA هدف شامل آلل های متفاوتی باشد، هتروداپلکس ها به صورت خود به خود تشکیل می شوند و در نتیجه ۲ هموداپلکس (Homoduplex) و ۲ هتروداپلکس به وجود می آیند که در ژل آکریل آمید با تأخیر حرکت می کنند (۱۵)؛ بنابراین با انجام هم زمان این ۲ روش در ژل، حساسیت تشخیص در هر ۲ روش افزایش می یابد. با توجه به اینکه در ایران مطالعات معدودی در زمینه اساس مولکولی HCM انجام شده است، این مطالعه با هدف بررسی احتمال حضور جهش در اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در استان چهارمحال و بختیاری طراحی و اجرا شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه که از نوع توصیفی است و در فاصله زمانی مهر ماه ۹۲ تا شهریور ماه ۹۳ انجام شد، تعداد ۳۰ نمونه از خون بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری مراجعه کننده به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دریافت شد. بر اساس یافته های بالینی و اکوکاردیوگرافی افرادی که ضخامت دیواره بطن چپ آن ها حداقل ۱۳ میلی متر بود و بیماری آن ها ژنتیکی بود، وارد مطالعه شدند (۱۶، ۱۷). نمونه های خونی پس از کسب رضایت نامه از افراد مبتلا و یا والدین آن ها و تکمیل پرسشنامه مربوط به اطلاعات بالینی و دموگرافیک گرفته شد. نمونه های خون هر فرد به میزان ۵ میلی لیتر خون محیطی در لوله های حاوی EDTA (۰/۵ M) ریخته و برای آزمایشات مولکولی به مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی واقع در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد منتقل شدند. نمونه های خون تا زمان شروع استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت استخراج

DNA از روش استاندارد فنل - کلروفرم استفاده شد و برای تعیین غلظت DNA روش اسپکتروفتومتری (اسپکتروفتومتر NANODROP 2000 USA) استفاده شده است (۱۷). برای مطالعه بر روی این ژن، ابتدا به منظور انجام واکنش های زنجیره ای پلیمراز PCR، پرایمرهای مورد نظر برای هر کدام از اگزون ها با استفاده از برنامه نرم افزاری Gene runner طراحی و از شرکت ژن فن آوران خریداری شدند. در این مطالعه از پرایمرهای تغییر یافته که در انتهای ۴ یا ۵ نوکلئوتیدی 3' هر پرایمر پیشرو ترجیحاً بازهای پیریمیدین (C به T و T به C) و بعضاً بازهای پورین تعویض شده اند، نیز استفاده شده است. بدین منظور نمونه هایی که محصول PCR آن ها با استفاده از پرایمر جهش یافته (Site Directed Mutagenesis) باشند، به عنوان نمونه های کنترل مثبت بوده و در باندهای ژل SSCP دارای تغییر و حرکت متفاوت خواهند بود. پرایمرهای جهش یافته در جدول شماره ۱ با علامت * مشخص شده اند.

جدول شماره ۱: پرایمرهای به کار رفته در مطالعه برای انجام PCR اگزون های ۲۷ و ۲۹

نام اگزون	اندازه قطعه	نام پرایمر	نوع پرایمر	توالی پرایمر
اگزون ۲۷	۲۷۵ bp	MY27-F	Forward	5'- CAGTGGGAGTGGGGTGTCACTG -3'
		MY27-R	Forward	5'- GGTGTCAATGGCGGGTCTTGTG -3'
		MY27-F*	Forward* Mutant	5'- CAGTGGGAGTGGGGTGGCAGTG -3'
		MY27-R*	Forward* Mutant	5'- TGATCCAGGTTCAAGGGTAAAGC -3'
اگزون ۲۹	۲۷۴ bp	MY29-F	Forward	5'- GAAGGGAACAAGGGGGCTC -3'
		MY29-R	Revers	5'- TGATCCAGGTTCAAGAGTAAAGC -3'
		MY29-F*	Forward* Mutant	5'- TGATCCAGGTTCAAGAGTAAAGC -3'
		MY29-R*	Forward* Mutant	5'- TGATCCAGGTTCAAGAGTAAAGC -3'

در تکنیک PCR-SSCP نیز می توان از روش طراحی پرایمرهای جهش یافته (تغییر یافته) برای تهیه نمونه های کنترل مثبت استفاده کرد، اما از آنجایی که اساس کار تکنیک PCR-SSCP بر حسب ساختار فضایی ماکرومولکول ها است، این نکته باید رعایت شود که تغییر ایجاد شده در پرایمرها باید بیش تر به سمت انتهای 3' آن ها باشد (۱۷). واکنش PCR برای هر اگزون به صورت اختصاصی و به منظور افزایش قطعه مورد نظر توسط دستگاه ترموسایکلر (ASTEC ژاپن)

در حجم ۲۵ میکرولیتر، انجام شد. مخلوط واکنش شامل اجزاء زیر بود: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X) (سیناژن ایران)، ۴ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) (سیناژن ایران)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۵۰ میکرومولار)، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومیک و در نهایت ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد/ میکرولیتر) (سیناژن ایران). پس از انجام چندین PCR و تغییر غلظت $MgCl_2$ در هر واکنش و با

بررسی ژل های رنگ آمیزی شده محصولات PCR، بهترین کیفیت باندهای محصولات PCR در غلظت ۵۰ میلی مولار از $MgCl_2$ مشاهده شد؛ بنابراین برای انجام PCR از غلظت ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$ استفاده شد. برنامه دمایی تنظیم شده برای اگزون های مورد مطالعه در جدول شماره ۲ آمده است.

جدول شماره ۲: برنامه دمایی تنظیم شده برای انجام واکنش PCR اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	سیکل
واسرشتگی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشتگی	۹۵	۱	۳۳
اتصال	۷۰	۱	
تکثیر	۷۲	۱	
تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱

۲ میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ و با ولتاژ ۳۰۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس ژل ها به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شده و رویت گردید. در صورت تأیید کیفیت باندها محصولات PCR آن ها جهت SSCP مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر نمونه به میزان ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۵ میکرولیتر از SSCP Dye در یک میکروتیوب مخلوط شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد روی هات پلیت قرار گرفتند، تا ۲ رشته DNA کاملاً از هم باز شوند. برای جلوگیری از اتصال مجدد رشته ها، بلافاصله میکروتیوب ها بر روی یخ قرار گرفتند. نمونه ها حداقل ۵ دقیقه بر روی یخ ماندند، همچنین ۲ میکرولیتر از DNA محصول PCR با ۲/۷ میکرولیتر EDTA مخلوط شد و طبق برنامه Touch Down در دستگاه PCR (corbett استرالیا) قرار گرفت (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: برنامه مورد استفاده در هتروداپلکس

مراحل	دما (درجه سلسیوس)	زمان	سیکل
واسرشتگی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشتگی	از ۹۵ به ۳۵ (هر سیکل ۱ درجه کاهش دما)	۳۰ ثانیه	۶۰
نگهداری	۴	۵ دقیقه	۱

اکریل آمید (MERCK آلمان) تهیه گردید و در تانک الکتروفورز قرار گرفت. از بافر TBE ۰/۶ X در تانک استفاده گردید. در واقع هتروداپلکس به عنوان تأیید SSCP به کار می رود؛ بنابراین هتروداپلکس مربوط به هر نمونه به همراه محصول PCR آماده شده هر نمونه برای SSCP، با هم مخلوط شده و در یک

چاهک از ژل پلی اکریل آمید بارگذاری می شود. مدت زمان و ولتاژ لازم برای نمونه های مختلف متفاوت می باشد و باید برای هر نمونه شرایط دمایی، ولتاژ و زمان مطلوب با انجام آزمایشات متعدد و کسب تجربه به دست آید. شرایط مربوط به هر اگزون در جدول شماره ۴ آمده است.

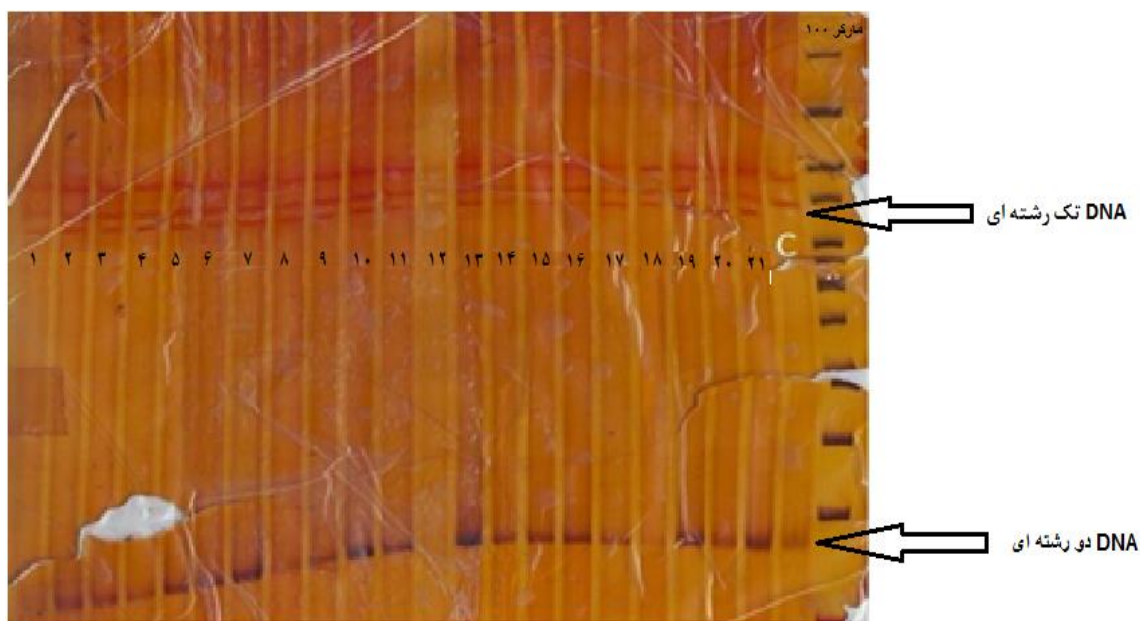
جدول شماره ۴: شرایط تنظیم شده جهت انجام الکتروفورز SSCP و SSCP/HA اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3

اگزون	غلظت ژل	آمپر	ولتاژ	دما	زمان	افزودنی ها
اگزون ۲۷	٪۱۰	۳۱ mA	۳۲۰-۳۵۰V	۱۲ °C	۷ ساعت	-
اگزون ۲۹	٪۱۲	۳۱ mA	۳۲۰-۳۵۰V	۱۲ °C	۸ ساعت	۳ گرم اوره ۱۰۰٪

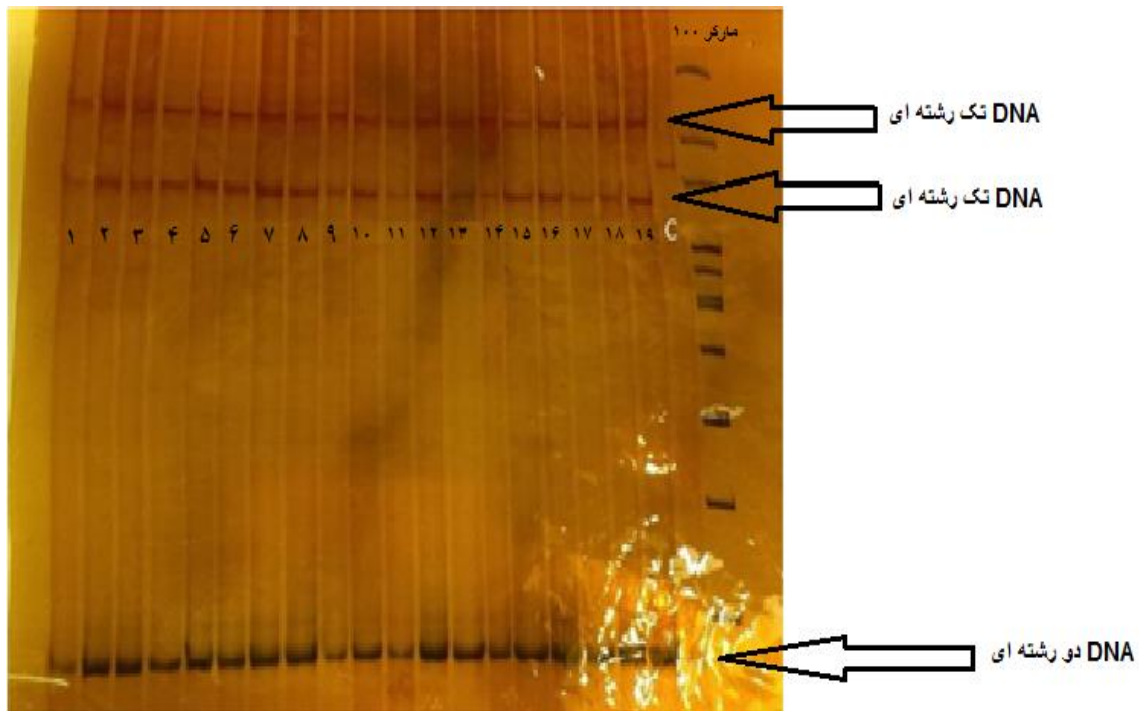
خون و تنگی درپچه آئورتی و یا نشانه های سندرمی بودند، از مطالعه حذف شدند و افراد انتخاب شده برای نمونه گیری دارای کاردیومیوپاتی هایپرتروفی با علت ژنتیکی بودند.

یافته ها:

۳۰ نفر از افرادی که ضخامت دیواره بطن چپ آن‌ها حداقل ۱۳ میلی متر بود، وارد مطالعه شدند. شرح افراد بدین صورت آورده شده است. افرادی که ضخامت دیواره بطن چپ آن‌ها بین ۱۳ تا ۱۷ میلی متر بود، ۵ نفر بودند؛ افرادی که ضخامت دیواره بطن چپ آن‌ها بین ۱۷ تا ۱۹ میلی متر بود، ۷ نفر بودند و افرادی که ضخامت دیواره بطن چپ آن‌ها بیش تر از ۱۹ میلی متر بود، ۱۸ نفر بودند. نمونه‌ها شامل ۱۵ مرد و ۱۵ زن با میانگین سنی ۴۹ سال و طیف سنی ۱۷ تا ۸۰ سال بودند. ۱۶ نفر از آن‌ها دارای سابقه خانوادگی از بیماری و ۱۴ نفر بدون سابقه خانوادگی از بیماری بودند. تمام افرادی که دارای علل غیر ژنتیکی از جمله فشار



C. نمونه کنترل مثبت؛ ۲۱-۱: نمونه های بیماران که در اگزوز ۲۷ آن ها هیچ گونه باند متفاوتی مشاهده نشد.



تصویر شماره ۲: ژل پلی اکریل آمید الکتروفورز SSCP/HA مربوط به اگزون ۲۹ ژن MYBPC3

C. نمونه کنترل مثبت؛ ۱-۱۹: نمونه های بیماران که در اگزون ۲۹ آن ها هیچ گونه باند متفاوتی مشاهده نشد.

بحث:

۲۴۱۴۵ شناسایی شد. نوکلئوتیدهای حذف شده (GTT) کدکننده والین هستند، بنابراین حذف چارچوب این اسید آمینه پیش بینی می شود (۲۱). در مطالعه ای که در اسپانیا انجام شد، در اگزون ۲۹ ژن MYBPC3 جهش Q998E در موقعیت c.C2992G شناسایی شد (۲۰). در مطالعه حاضر، هیچ گونه تغییری در اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM مورد مطالعه مشاهده نشد. با چندین بار تکرار آزمایش و به صورت تجربی، شرایط مطلوب PCR-SSCP برای هر کدام از اگزون های مورد مطالعه به دست آمد. تمام شرایط تکنیک PCR-SSCP به منظور ارتقاء کیفیت تحقیق، رعایت شد. این روش که در برخی مطالعات دارای دقت ۱۰۰٪ نیست، اما با استفاده از نمونه های کنترل می توان دقت را به ۱۰۰٪ رساند (۲۲، ۱۴). نمونه هایی که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت ایجاد کردیم، هم زمان با نمونه های دیگر روی ژل برده شدند و الگوی متفاوتی ایجاد کردند که نشان دهنده صحت واکنش انجام شده

کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در بیش تر موارد به دلیل جهش در یکی از ژن های سارکومری ایجاد می شود. در این مورد تاکنون حدود ۱۹۴ جهش در انسان شناخته شده است (۱۸). در سایر مطالعات انجام شده، در اگزون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به HCM تغییر گزارش شده بود که برخی از آن ها به شرح زیر می باشند: در مطالعه ای که در آمریکا انجام شد، در اگزون ۲۷ ژن MYBPC3 تغییر نوکلئوتیدی CGA>TGA با واریانت R943X و تغییر نوکلئوتیدی del CT و تغییر نوکلئوتیدی CAA>TAA با واریانت Q969X شناسایی شد (۱۹). در مطالعه ای که در اسپانیا انجام شد، در اگزون ۲۹ ژن MYBPC3 جهش Q998E در موقعیت c.C2992G شناسایی شد (۲۰). در مطالعه ای که در آمریکا انجام شد، در اگزون ۲۹ ژن MYBPC3 تغییر نوکلئوتیدی ins AA شناسایی شد (۱۹). در مطالعه ای که در استرالیا انجام شد، در اگزون ۲۹ ژن MYBPC3 حذف ۳ جفت باز از نوکلئوتید ۲۴۱۴۳ تا

است. علاوه بر این، نتایج این روش با آزمایش دیگر شامل، روش هتروداپلکس نیز هم زمان با PCR-SSCP جهت افزایش دقت به کار رفت؛ بنابراین داده های این تحقیق با اطمینان کامل ارائه شده است.

ژن MYBPC3 در ایجاد بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در بیماران مورد مطالعه نقش ندارد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله صمیمانه از کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و پرسنل محترم بخش اکوکاردیوگرافی بیمارستان هاجر استان چهارمحال و بختیاری و کلیه بیماران که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری رساندند و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد جهت تصویب این پایان نامه به شماره ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۳۱۰۰۳ در تاریخ ۱۶ آذر ماه سال ۱۳۹۲ کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر که به منظور تعیین جهش ها در آگرون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفی در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد، هیچ گونه تغییری در آگرون های ۲۷ و ۲۹ ژن MYBPC3 در این بیماران مشاهده نشد. این نتایج نشان می دهد که جهش در آگرون های ۲۷ و ۲۹

منابع:

1. Ashrafian H, Watkins H. Reviews of translational medicine and genomics in cardiovascular disease: new disease taxonomy and therapeutic implications cardiomyopathies: therapeutics based on molecular phenotype. J Am Coll Cardiol. 2007; 49(12): 1251-64.
2. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. JAMA. 1996; 276(3): 199-204.
3. Thiene G, Corrado D, Basso C. Revisiting definition and classification of cardiomyopathies in the era of molecular medicine. Eur Heart J. 2008; 29(2): 144-6.
4. McLeod CJ, Bos JM, Theis JL, Edwards WD, Gersh BJ, Ommen SR, et al. Histologic characterization of hypertrophic cardiomyopathy with and without myofibrillar mutations. Am Heart J. 2009; 158(5): 799-805.
5. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, Suk HJ, Anan R, O'Donoghue A, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med. 1995; 332(16): 1058-64.
6. Tang Z, McGowan BS, Huber SA, McTiernan CF, Addya S, Surrey S, et al. Gene expression profiling during the transition to failure in TNF-alpha over-expressing mice demonstrates the development of autoimmune myocarditis. J Mol Cell Cardiol. 2004; 36(4): 515-30.
7. Blaxall BC, Spang R, Rockman HA, Koch WJ. Differential myocardial gene expression in the development and rescue of murine heart failure. Physiol Genomics. 2003; 15(2): 105-14.
8. Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol. 2012; 9(2): 91-100.
9. Le Corvoisier P, Park HY, Carlson KM, Marchuk DA, Rockman HA. Multiple quantitative trait loci modify the heart failure phenotype in murine cardiomyopathy. Hum Mol Genet. 2003; 12(23): 3097-107.
10. Yussman MG, Toyokawa T, Odley A, Lynch RA, Wu G, Colbert MC, et al. Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. Nat Med. 2002; 8(7): 725-30.
11. Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J. Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(12): 6745-50.
12. van Dijk SJ, Dooijes D, dos Remedios C, Michels M, Lamers JM, Winegrad S, et al. Cardiac myosin-binding protein C mutations and hypertrophic cardiomyopathy:

- haploinsufficiency, deranged phosphorylation, and cardiomyocyte dysfunction. *Circulation*. 2009; 119(11): 1473-83.
13. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, et al. [Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(1): 48-56.
 14. Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat*. 1993; 2(5):338-46.
 15. Ravnik-Glavac M, Glavac D, Dean M. Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet*. 1994; 3(5): 801-7.
 16. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*. 2008; 10(10): 933-89.
 17. Huang X, Song L, Ma AQ, Gao J, Zheng W, Zhou X, et al. A malignant phenotype of hypertrophic cardiomyopathy caused by Arg719Gln cardiac beta-myosin heavy-chain mutation in a Chinese family. *Clin Chim Acta*. 2001; 310(2): 131-9.
 18. Hougs L, Havndrup O, Bundgaard H, Kober L, Vuust J, Larsen LA, et al. One third of Danish hypertrophic cardiomyopathy patients with MYH7 mutations have mutations [corrected] in MYH7 rod region. *Eur J Hum Genet*. 2005; 13(2): 161-5.
 19. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44(9): 1903-10.
 20. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, et al. [Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(1): 48-56.
 21. Bagnall RD, Yeates L, Semsarian C. The role of large gene deletions and duplications in MYBPC3 and TNNT2 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2010; 145(1): 150-3.
 22. Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*. 2000; 9(11): 1699-710.

The study of mutations presence in exons 27 and 29 of MYBPC3 gene by PCR-SSCP/HA method in patients with hypertrophy cardiomyopathy in Chaharmahal and Bakhtiari province

Saeidi E¹, Hashemzadeh Chaleshtori M^{2*}, Doosti A¹, Parchami Bajue S¹

¹Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. Iran; ²Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 29/Jul/2015 Accepted: 31/Oct/2015

Background and aims: Hypertrophy cardiomyopathy (HCM) is the most common type of heart disease with monogenic inheritance distinguished by thickening of left ventricle, contractile dysfunction and potentially fatal arrhythmias. Great progress in clarifying the genetic basis of HCM obtained. It was identified more than 900 unique mutations in 20 genes. Mutations in the gene MYBPC3 (which encodes the cardiac Myosin binding protein C) are about 40% of clinical cases. This study aimed to investigate the presence of mutations in exons 27 and 29 of MYBPC3 gene in patients with hypertrophy cardiomyopathy in Chahar Mahal and Bakhtiari province.

Methods: 30 probands of hypertrophy cardiomyopathy were selected from patients referred to cardiac clinic of the Shahrekord Medical University. To extract DNA from blood samples of patients we used standard phenol – chloroform protocol. The exons 27 and 29 were amplified by Polymerase Chain Reaction and were converted to single-stranded with Single Strand Conformation Polymorphism and they electrophoresed with double-stranded samples on polyacrylamide gels.

Results: Extracted DNA was electrophoresed and the attraction ratio was examined and the outcomes indicate that the DNA extraction and quality of samples are respectable. By investigation of obtained results from SSCP/HA electrophorese in Polyacrylamide, no change was found in exons 27 and 29 of MYBPC3.

Conclusion: Any of the patients had no mutation in exons 27 and 29 gene MYBPC3. Based on the results of this study there is no mutation in exons 27 and 29 gene MYBPC3 of HCM patients with autosomal dominant inheritance. It concluded that exons 27 and 29 of MYBPC3 do not have any role to cause HCM in examined patients.

Key words: Hypertrophy cardiomyopathy, Mutation, MYBPC3, PCR-SSCP/HA.

Cite this article as: Saeidi E, Hashemzadeh Chaleshtori M, Doosti A, Parchami Bajue S. The study of mutations presence in exons 27 and 29 of MYBPC3 gene by PCR-SSCP/HA method in patients with hypertrophy cardiomyopathy in Chaharmahal and Bakhtiari province. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(1): 27-35.

***Corresponding author:**

Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 009833330709, E-mail: mchalesh@yahoo.com